



(19) REPUBLICA DE CHILE  
MINISTERIO DE ECONOMIA  
FOMENTO Y RECONSTRUCCION  
SUBSECRETARIA DE ECONOMIA



DEPARTAMENTO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

(11) N° REGISTRO

(12) TIPO DE SOLICITUD:



INVENCIÓN



MODELO DE UTILIDAD



PRECAUCIONAL



MEJORA



REVALIDA

(43) Fecha de Publicación:

(51) Int. Cl. 4:

(21) Número de Solicitud:

875-95

(22) Fecha de Solicitud

16.06.95

(30) Número de Prioridad: (país, n° y fecha)

NL 94201742.7 17.06.94

(71) Nombre Solicitante: (Incluir dirección y tel.)

**GIST-BROCADES B.V.**

Wateringseweg 1 PO-Box 1,  
2600 MA Delft.  
HOLANDA

(72) Nombre Inventor(es): (Incluir dirección)

- VAN EIJK, Johannes Henricus, 504 Bismark Way,  
King of Prussia PA 19406. USA

- MUTSAERS, Johanna Henrica Gardina Maria,  
Wielewaalstraat 2, 2623 GT Delft. NL

(74) Representante: (Incluir dirección y teléfono)

**SARGENT & KRAHN**  
Moneda 970, Piso 10, Santiago  
368-3500

(54) Título de la Invención: (máximo 330 caracteres)

**"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA MASA PARA UN PRODUCTO HORNEADO  
ADICIONANDO CICLODEXTRINA GLUCANO TRANSFERASA DE MANERA DE AUMENTAR SU VOLUMEN  
PRODUCIENDO CICLODEXTRINAS IN SITU, SU COMPOSICION DE CICLODEXTRINA, UTIL COMO REEMPLAZANTE  
DE GRASA Y COMO MEJORADOR DEL SABOR".**

(57) Resumen: (máximo 1600 caracteres)


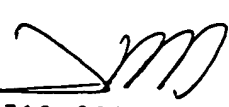
Un procedimiento para la preparación de una masa para un producto horneado que comprende incorporar en la masa ciclodextrina glucano transferasa en una cantidad como para aumentar el volumen del producto horneado, produciendo ciclodextrina in situ y por lo cual no se agrega ciclodextrina junto con la ciclodextrina glucano transferasa.

REF. 97.670

ORIGINAL

INSTRUCCIONES:

1. LLENE SOLAMENTE LOS RECUADROS DE TONO ROSADO CON CARACTERES NEGROS DE MAQUINA (NO MANUSCRITO)  
 2. SE ENTENDE POR PRIORIDAD AQUELLA PROTECCION SOLICITADA O CONCEDIDA ANTERIORMENTE POR EL MISMO INVENTO, GENERALMENTE EN EL EXTRANJERO

1. FECHA DE SOLICITUD DIA MES AÑO		 REPUBLICA DE CHILE MINISTERIO DE ECONOMIA FOMENTO Y RECONSTRUCCION SUBSECRETARIA DE ECONOMIA DEPTO. PROPIEDAD INDUSTRIAL	2. NUMERO DEL PRIVILEGIO
3. FECHA DE PUBLICACION DIA MES AÑO			4. NUMERO DE SOLICITUD <b>875 - 95</b>
5. TIPO DE SOLICITUD <input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION <input type="checkbox"/> PATENTE PRECAUCIONAL <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD <input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL <input type="checkbox"/> TRANSFERENCIA <input type="checkbox"/> CAMBIO DE NOMBRE <input type="checkbox"/> LICENCIA		6. PRIORIDAD: TIPO <input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION <input type="checkbox"/> PATENTE PRECAUCIONAL <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD <input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL 7. ESTADO <input type="checkbox"/> CONCEDIDA <input checked="" type="checkbox"/> EN TRAMITE	8. DOCUMENTOS ACOMPAÑADOS <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input checked="" type="checkbox"/> MEMORIA DESCRIPTIVA <input checked="" type="checkbox"/> PLIEGO DE REIVINDICACIONES <input type="checkbox"/> DIBUJOS <input type="checkbox"/> PODER <input type="checkbox"/> CESION <input type="checkbox"/> COPIA PRIORIDAD <input type="checkbox"/> PROTOTIPO
9. TITULO O MATERIA DE LA SOLICITUD <b>"Uso de ciclodextrina glucano transferasa en una masa de pan para aumentar el volumen del producto horneado"</b>		10. SOLICITANTE(S): (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - CALLE, COMUNA, CIUDAD, PAIS, TELEFONO) <b>GIST-BROCADES B.V.          Wateringseweg 1 PO-Box 1, 2600 MA Delft. HOLANDA</b>	
11. INVENTOR O CREADOR: (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - NACIONALIDAD) <b>VAN ELIJK, Johannes Henricus y MUTSAERS, Johanna Henrica Gerdina Maria. Estadounidense y holandés.</b>		12. REPRESENTANTE: (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - CALLE, COMUNA, CIUDAD, TELEFONO) <b>LETELIER, José Luis          Moneda 970 Piso 11° Santiago.</b>	
13. DECLARO/DECLARAMOS QUE LOS DATOS QUE APARECEN EN LOS RECUADROS DE TONO ROSADO SON VERDADEROS Y TAMBIEN CONOCER EL ART. 44 DE LA LEY Nº 13.039 SOBRE PROPIEDAD INDUSTRIAL Y QUE EL PRESENTE DOCUMENTO CONSTITUYE UNA SOLICITUD FORMAL.  <b>79.713.300-0</b>		RECEPCION DEPTO. PROPIEDAD INDUSTRIAL RECEPCION DE DOCUMENTO <b>16.06.95</b> CHILE AGENTES DE INVENCION	
FIRMA Y R.U.T. REPRESENTANTE		FIRMA Y R.U.T. SOLICITANTE	

## MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a composiciones mejoradoras del pan y a métodos que usan estas composiciones para mejorar la calidad de los productos horneados como el pan.

Los mejoradores del pan son mezclas complejas que contienen diversos ingredientes funcionales, tales como agentes oxidantes y reductores (por ejemplo, ácido ascórbico, cisteína), enzimas (por ejemplo alfa-amilasa, hemicelulasa), emulsionantes (por ejemplo DATA-éster, monoglicéridos, SSL), materiales grasos (por ejemplo gñasa, lecitina) y vehículos o materiales abultadores (almidón, azúcares, etc.). Muchos mejoradores del pan comúnmente usados contienen grasas que se usan para aumentar el volumen y la suavidad de las migas. Sin embargo, es conveniente minimizar el uso de grasas, ya que hay una fuerte demanda de los consumidores por alimentos más sanos, y particularmente alimentos con un contenido reducido de grasas.

También, para mejorar la calidad nutritiva del pan, a menudo se agrega a la masa leche en polvo descremada. Esta adición, sin embargo, da como resultado un volumen disminuido del pan (se refiere a un pan grande). Para contrarrestar esto, normalmente se agrega manteca grasa a estas masas que contienen leche en polvo para mantener un alto volumen del pan. Nuevamente, esto lleva a un contenido indeseablemente alto de grasa.

La resistencia de los consumidores a los aditivos grasos va en aumento y, por lo tanto, hay una necesidad

constante de reemplazar la manteca por aditivos amigos de los consumidores, proporcionando así productos horneados con un bajo contenido de grasa y un alto volumen del pan.

Se ha encontrado (H.O. Kim y R.D. Hill (Cereal Chemistry (1984) 61, N°5, 406-409)) que la beta-ciclodextrina (cicloheptaamilosa, ciclomaldodextrina o dextrina de Schardinger) aumenta el volumen del pan. La beta-ciclodextrina aumenta la capacidad de hincharse y la solubilidad de los gránulos de almidón de trigo durante la gelatinización. Esto da como resultado un aumento del volumen del pan, una mayor absorción de agua en el Farinógrafo, un tiempo de desarrollo aumentado y una mejor tolerancia de mezclado. También mejora el sabor del pan. Una seria desventaja de este uso de la beta-ciclodextrina es que aumenta la pegajosidad de la masa. Esto hace que las masas que contienen beta-ciclodextrina sean inapropiadas para ser manipuladas por las máquinas.

Otra desventaja seria de usar beta-ciclodextrina es que se requieren altos niveles, típicamente entre 1 y 2% (en base al peso de la harina), para obtener el aumento deseado del volumen del pan.

Es un objetivo de esta invención superar estos problemas y proporcionar productos horneados que tengan un sabor mejorado, un volumen aumentado y un contenido de grasa reducido.

El término "producto horneado", como se usa aquí, debe comprenderse como que se refiere a cualquier producto horneado a base de cereales, tales como harina de trigo y/o centeno, y que lleva incorporadas levadura y agua. En la mayoría de los casos también habrá sales presentes,

opcionalmente con grasas, emulsionadores, enzimas, azúcar y otros aditivos. En la preparación, estos ingredientes se mezclarán formando una masa o pasta homogénea, ésta se dejará por algún tiempo a una temperatura adecuada y se horneará para producir un producto con aire, consumible, tal como el pan.

En consecuencia la invención provee, en un aspecto, un procedimiento para la preparación de una masa para un producto horneado que comprende incorporar en la masa ciclodextrina glucano transferasa en una cantidad como para aumentar el volumen del producto horneado.

De acuerdo con la presente invención, la ciclodextrina glucano transferasa (CGTasa) se incorpora en una composición mejoradora del pan que se agrega a los otros ingredientes de la masa. En otro aspecto, la invención provee, por lo tanto, una composición mejoradora del pan para usar en un procedimiento de la invención, que comprende ciclodextrina glucano transferasa y uno o más ingredientes secos de la masa adicionales. Esta composición puede comprender, por ejemplo, toda o una porción de la harina requerida para la preparación del producto horneado. Las ciclodextrinas se forman in situ por la acción de la CGTasa convirtiendo el almidón y los compuestos relacionados con el almidón en la masa.

Sorprendentemente, se ha encontrado que el uso de la CGTasa en lugar de la beta-ciclodextrina no provoca los problemas de manipulación de la masa observados cuando se usa la beta-ciclodextrina para mejorar la calidad del pan. Mientras las masas que contienen beta-ciclodextrina se vuelven muy pegajosas y por lo tanto difíciles de manipular durante el redondeado y el moldeado, las masas que contienen CGTasa

tienen una excelente capacidad de ser trabajadas por máquinas, posiblemente porque la acción de la CGTasa asegura que las ciclodextrinas se formen gradualmente en la masa después del mezclado. Por lo tanto, sólo pequeñas cantidades de ciclodextrinas están presentes durante las primeras etapas de la fabricación del producto horneado, tales como los pasos iniciales de formación de la masa inmediatamente después del mezclado, cuando altos niveles de ciclodextrinas podrían causar una severa pegajosidad de la masa. Además, la CGTasa produce no sólo beta-ciclodextrina sino también otras ciclodextrinas que contribuyen a las características mejoradas de la masa y del producto horneado, tales como volumen del pan y sabor.

En general, las CGTasas adecuadas para usar de acuerdo con la presente invención tienen las siguientes características:

- son "extracelulares" en el sentido de que son producidas o secretadas extracelularmente;
- pueden requerir  $\text{Ca}^{2+}$  para permanecer activas;
- su pH óptimo es ligeramente ácido.

El óptimo de temperatura de la CGTasa usada es un parámetro de menor importancia, pero pueden usarse CGTasas que tienen óptimos a alta y a baja temperatura de acuerdo con la invención. Por ejemplo, una CGTasa que tiene un óptimo de temperatura de 30-60°C (termolábil) y/o una CGTasa termoestable (óptimo de 80-95°C), pueden usarse ventajosamente en la preparación de productos horneados.

Las enzimas ciclodextrina glucano transferasas (conocidas como CGTasa, ciclomaltodextrina glucanotransferasa o amilasa de Bacillus macerans; E.C. 2.4.1.19) son algunos de

los miembros más inusuales de la familia de las glucosidasas amilolíticas. Mientras la mayoría de las glucosidasas catalizan predominantemente una sola reacción, la CGTasa posee tanto capacidades sintéticas como hidrolíticas fuertes, además de tener una especificidad de producto múltiple. Las CGTasas producen ciclodextrinas con 6, 7 y 8 residuos glucosilos y una variedad de malto-oligosacáridos lineales, mediante reacciones de desproporción y acoplamiento.

Las ciclodextrinas están compuestas de residuos de glucosa unidos por enlaces alfa-1,4 glicosídicos para formar un sacárido con forma de anillo sin extremo reductor.

Se han aislado CGTasas de varias especies microbiológicas. Las CGTasas adecuadas para el propósito de la presente invención pueden obtenerse, por ejemplo de especies de Bacillus, tales como Bacillus macerans, Bacillus stearothermophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus megaterium, Bacillus subtilis, Bacillus ohbensis, o de especies de Micrococcus, de Klebsiella Pneumonia, Klebsiella Oxytoca o de Thermoanaerobacter. CGTasas adecuadas también pueden ser producidas por métodos recombinantes en cepas huéspedes que han sido sometidas a ingeniería genética, lo que las ha hecho adecuadas para la producción de CGTasa. Por ejemplo, Escherichia coli que expresa genes de CGTasa puede actuar como una fuente de la enzima. Más información sobre CGTasa está dada en B.Y. Tao (Enzymes in Biomass Conversion (1991), Capítulo 28, 372-383; American Chemical Society). Varias preparaciones de enzimas de CGTasa están disponibles en el comercio y son apropiadas para ser usadas en la invención.

Se puede usar cualquier cantidad eficaz de CGTasa. En general sin embargo, se empleará de 5 a 5000 unidades de

CGTasa por kilogramo de harina, de preferencia, por ejemplo, de 50 a 500 unidades por 1 kg de harina. Se podrá apreciar que la cantidad preferida de CGTasa variará según el tipo de masa y el procedimiento de preparación de la masa particulares usados. Así, en el caso de un procedimiento para masa corriente americana, una cantidad preferida puede ser, por ejemplo, de 75 U/kg a 300 U/kg, mientras que en un procedimiento de fabricación de pan holandés, una cantidad preferida será, por ejemplo, de 175 U/kg a 375 U/kg.

Se prefieren las preparaciones de CGTasa y las composiciones mejoradoras del pan que tienen cantidades bajas o muy bajas de proteasa.

Además de la CGTasa, las composiciones mejoradoras del pan y las masas de la invención pueden comprender ventajosamente glucosa oxidasa. La adición de glucosa oxidasa reduce la pegajosidad de la masa.

La presente invención será demostrada más extensamente mediante los siguientes ejemplos. Debe hacerse notar que la presente invención de ninguna manera está limitada a estos ejemplos.

Para los propósitos de estos ejemplos, la actividad enzimática se midió por el Ensayo de amilasa Phadebas (marca comercial) de Pharmacia. En este método, se mide espectrofotométricamente la solubilización por CGTasa de almidón marcado con tintura, en un tampón (acetato 0,1 M,  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM, pH 5,5), durante 15 minutos a 30°C. Una Unidad equivale a alrededor de 10 unidades SKB. El uso de un ensayo de amilasa para la determinación de la actividad de la CGTasa ha sido descrito por R.L. Starnes y colaboradores; (Enzymes



in Biomass Conversion, ch. 29, Starch liquefaction, 1991, American Chemical Society).

### Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra la aplicabilidad de la CGTasa como un reemplazante de la grasa en un procedimiento para masa corriente americana.

Se hornearon panes chicos a partir de trozos de masa de 150 g, obtenidos mezclando 200 g de harina de trigo (100%), 106 ml de agua (53%), 1,4 g de levadura seca instantánea (0,7%, Gist-Brocades N.V., Delft, Holanda), 3 g de sal (1,5%), 12 g de azúcar (6%), 8 g de leche en polvo descremada (4%), 4 mg de ácido ascórbico (20 ppm) y una cantidad variable de CGTasa (de Bacillus macerans) o manteca o beta-ciclodextrina. Después de mezclar durante 6 minutos y 15 segundos a 52 r.p.m. en una mezcladora de rodillo, la masa fue dividida, fermentada por 1 hora y 45 minutos a 30°C, punzada, fermentada por 25 minutos más, moldeada y puesta en cestillos. Después de una fermentación final de 50 minutos a 30°C, la masa fue horneada por 20 minutos a 200°C. El volumen del pan fue determinado por el método de desplazamiento de semilla de colza.

Los resultados obtenidos se dan en la Tabla 1.

Tabla 1

Adiciones	Volumen (%)
ninguna	100
manteca 3%	124
75 U/kg de CGTasa	118
300 U/kg de CGTasa	132
- - Amylase P200 (25 ppm) y	
Amylase H400* (150 ppm)	113
beta-ciclodextrina 1,5%	120

\*Amylase P200 es una amilasa fungal y Amylase H400 es una amilasa con actividades de hemicelulasa, ambas de Gist-Brocades.

El efecto sobre el volumen que se obtiene con la manteca, puede obtenerse o incluso mejorarse con CGTasa. Además, está claro en los resultados que el efecto sobre el volumen de la CGTasa es aún mayor que el efecto que se obtiene con la combinación de Amylase P200 y H400. Esta última combinación es una mezcla de enzimas comúnmente usada por la industria del pan para mejorar la calidad del pan.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra el efecto de CGTasa sobre el volumen en un tipo de pan holandés.

Se hornearon panes chicos a partir de trozos de masa de 160 g, obtenidos mezclando 200 g de harina de trigo (100%), 106 ml de agua (53%), 1,4 g de levadura seca instantánea (0,7%, Gist-Brocades N.V., Delft, Holanda), 4 g de sal (2%), 3 g de azúcar (1,5%), 5 mg de alfa-amilasa fungal P200 (25 ppm, Gist-Brocades), 4 mg de ácido ascórbico (20 ppm) y una cantidad variable de CGTasa (de Bacillus macerans) o beta-ciclodextrina. Después de mezclar durante 6 minutos y 15 segundos a 52 r.p.m. en una mezcladora de rodillo, la masa fue dividida, fermentada por 1 hora y 45 minutos a 30°C, punzada, fermentada por 25 minutos más, moldeada y puesta en cestillos. Después de una fermentación final de 70 minutos a 30°C, la masa fue horneada por 20 minutos a 225°C. El volumen del pan fue determinado por el método de desplazamiento de semilla de colza.

Los resultados obtenidos se dan en la Tabla 2.

Tabla 2

Adiciones	Volumen (%)
ninguna	100
175 U/kg de CGTasa	116
375 U/kg de CGTasa	122
beta-ciclodextrina 2%	114

Los resultados demuestran que el efecto de la CGTasa sobre el volumen es mayor que el efecto de 2% de beta-ciclodextrina.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de una masa para un producto horneado CARACTERIZADO porque comprende incorporar en la masa ciclodextrina glucano transferasa en una cantidad como para aumentar el volumen de producto horneado, produciendo ciclodextrina in situ y por lo cual no se agrega ciclodextrina junto con la ciclodextrina glucano transferasa.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la ciclodextrina glucano transferasa se emplea en razón de 5-5000 unidades por kg de harina.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque la ciclodextrina glucano transferasa se emplea a razón de 50-500 unidades por kg de harina.
4. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3, CARACTERIZADO porque dicha masa omite la manteca.
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque dicha masa incluye leche en polvo descremada.
6. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5, CARACTERIZADO porque dicha masa incluye glucosa oxidasa.
7. Una composición del pan para ser usada en un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 6, la composición CARACTERIZADA porque comprende ciclodextrina glucano transferasa y uno o más ingredientes secos adicionales de la masa, que es libre de ciclodextrinas.

8. Una composición del pan de acuerdo con la reivindicación 7, CARACTERIZADA porque incluye glucosa oxidada.

9. El uso de la ciclodextrina glucano transferasa de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque sirve como un reemplazante de la grasa en la preparación de una masa.

10. El uso de la ciclodextrina de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque sirve como mejorador del sabor en la preparación de una masa.